

チロシナーゼと基質複合体結晶構造解析に基づいた反応機構の解明

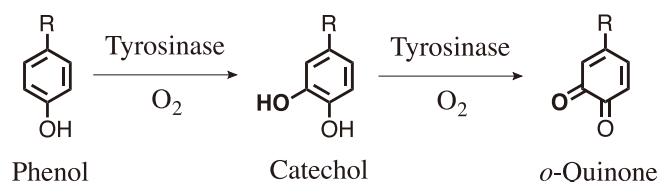
大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

藤 枝 伸 宇

Tyrosinase is a copper enzyme widely distributed in nature and has anti-ferromagnetically coupled binuclear copper ions in the active site, where the dioxygen molecule can be reductively activated into $[(\mu-\eta^2:\eta^2\text{-peroxide})\text{dicopper(II)}]$ species. This active oxygen species play a central role in catalyzing the hydroxylation of phenols to catechols and the subsequent oxidation of catechols to o-quinones. However, the details of the binding mode of substrate tyrosine have been still a long-standing mystery to be resolved. We have reported the high-resolution crystal structures of recombinant pro-form tyrosinase from yellow mold. In the pro-form tyrosinase, the active site is covered by C-terminal shielding domain, which functions as copper chaperone and can be proteolytically cleaved off to induce the catalytic activity. In this work, we have determined the crystal structure of the active-form tyrosinase in order to compare the structures between the pro- and active-form tyrosinase. First, the active-form tyrosinase was prepared by trypsin treatment of pro-form tyrosinase and purified by gel filtration chromatography. The purified protein was crystallized by hanging-drop vapor diffusion method using the precipitant solution containing polyethylene glycol. X-ray diffraction data was collected at Spring-8 and determined the crystal structure of the active-form tyrosinase. There was little difference in overall structures of pro- and active-form tyrosinase. We have succeeded in determining the crystal structures of complex with inhibitors. Kojic acid was stacked on histidine coordinated to copper ion. Based on the details of their binding modes, the reaction mechanism will be updated and discussed.

1. 緒 言

チロシナーゼはヒトからバクテリアまで幅広い生物が持つ銅含有酵素であり、生体内でのメラニン色素の合成などに関与している。チロシナーゼは酸素を酸化剤としてL-チロシンの水酸化反応を触媒し、生じたL-ドーパを酸化することでドーパキノンを生産する (Scheme 1)。ドーパキノンはその後、自己重合反応などを経てメラニンとなり、細胞を紫外線から守る色素となる。チロシナーゼは活性中心に2つの銅イオンを持ち、この銅イオンに酸素分子が結合した銅-活性酸素種オキシ体がチロシンなどフェノール類の水酸化反応を行い、続いて銅2価種のメット体がドーパなどカテコール類の酸化を行うと考えられている。その後、デオキシ体に酸素が結合し再びオキシ体が生成することで触媒サイクルが完了する。このようにチロシナーゼは芳香族炭素を位置選択的に直接水酸化することから、触媒としての工業的利用が期待できる。一方で、生体内で皮膚の色素沈着や食品の褐変などの原因になることから、その阻害剤の開発も活発に行われている。そのためチロシナーゼの反応機構を解明することは、触媒、医薬、食品など広範な分野への貢献となる。特に、メラニン形成は肌のシミの直接的原因であり、コスメトロジーへの影響は大きい。



Scheme 1 Tyrosinase catalytic reaction

このような背景のもと、長年、チロシナーゼの酵素反応の機構について多くの研究が行われてきた。当研究室をはじめとし多くの研究者がモデル錯体や実際の酵素を用いた詳細な速度論的研究を行いチロシナーゼ水酸化反応の機構が提案されている。この機構によると基質フェノールがフェノレートとして銅イオンに配位し、芳香族求電子置換反応によりフェノールの芳香族炭素と酸素の結合が形成される。また近年、チロシナーゼのX線結晶構造解析に成功した例がいくつか報告されてきた。マッシュルーム由来のチロシナーゼの活性中心では、2つの銅イオン (CuAとCuB) がそれぞれ3つのヒスチジン残基に配位されていることが知られている¹⁾。また別のグループからは活性中心の金属を亜鉛に置換し、活性のない状態でのチロシナーゼと基質のL-チロシンとの複合体結晶構造が報告されている²⁾。しかし、これらの結晶構造を重ね合わせてみるとCuAとZnAでその位置が大きく異なっていることがわかり、活性のある銅イオンが結合した本来の基質結合状態であるかどうか明確ではない。併せて分解能も現状では詳細な相互作用が議論できるほど高くない。

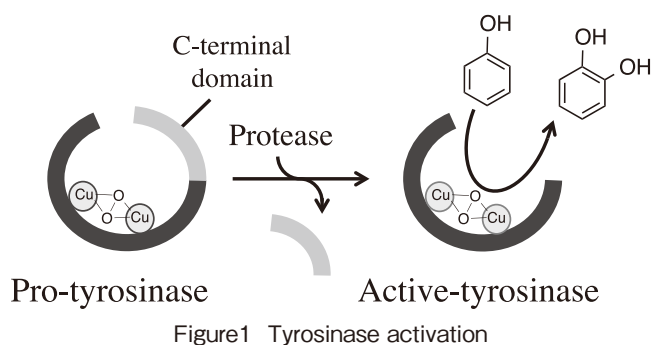
一方で、当研究室では麹菌由来プロチロシナーゼの高分解能構造解析に成功してきた³⁾。プロチロシナーゼは今まで示したチロシナーゼとは異なり、銅結合触媒ドメインに



Structural Approach to Molecular Mechanism of Tyrosinase

Nobutaka Fujieda

Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University



加えC末端ドメインを持つチロシナーゼの前駆体型であることが明らかとなった (Figure1)。これら結果より、我々はこのC末端ドメインがチロシナーゼの活性中心を覆い隠すことで細胞毒となる酵素活性を抑えており、酵素反応が必要になるとC末端ドメインがプロテアーゼにより切断され活性を持つ活性型チロシナーゼとなることを提唱してきた。本研究ではこのプロチロシナーゼからプロテアーゼ処理によって活性型チロシナーゼを調製し、銅イオンが結合した活性型のチロシナーゼと基質との複合体結晶構造を詳細な議論が可能な高い分解能で決定し、チロシナーゼの反応機構について議論することを目的とした。

2. 方法

まずは常法に従い野生型プロチロシナーゼの大腸菌による発現とアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。SDS-PAGEで単一バンドが見られ、プロチロシナーゼが精製できたことを確認した。次にプロチロシナーゼを活性型チロシナーゼに変換するために、トリプシンによってプロテアーゼ処理を行ったところ、活性型チロシナーゼは自身の持つチロシン残基を酸化し、その後重合によって褐変、沈殿してしまうことが明らかとなった。そこで野生型ではなく酵素活性を下げた変異体を用いた。麴菌由来チロシナーゼは活性中心の銅イオンに配位しているヒスチジンのうちの1つ

が近傍のシステイン残基と共有結合による架橋を形成しているが、今回このシステインをアラニンに変え架橋をなくした変異体を用いた。この変異体では活性の指標となる触媒回転数 k_{cat} が一桁程度低下するが、活性種のオキシ体は野生型同様に生成し、他のチロシナーゼと比較しても十分な活性を維持していることがわかっている。この変異体を用い、まずは野生型同様プロ型で精製を行った。その後トリプシンを用いてプロテアーゼ処理を行い、ゲル濾過クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーによって活性型変異体の精製を行った。これらクロマトグラフィーの溶出グラフから単一の分子として活性型チロシナーゼを精製できたことが確認された。精製した活性型変異体の結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法によって行った。

3. 結果

SPring-8でX線回折データを測定し、1.6 Åの分解能で活性型変異体の結晶構造の決定に成功した。活性型ではC末端ドメインが完全に取り除かれていることが確認でき、さらには重ね合わせると全体構造はプロチロシナーゼの銅結合触媒ドメインからほぼ変化しておらず、C末端ドメインの除去による構造変化はほぼ見られなかった。しかし、活性中心を見てみると、銅イオンの位置に大きな変化が見られた。プロチロシナーゼではCuA、CuBともに3つのヒスチジンが配位している構造であるのに対し、活性型チロシナーゼではCuA側で3つのヒスチジンが配位したCuA1に加えて、2 Å離れた位置にヒスチジン103が外れ、残りのヒスチジン2つと水分子1つが配位したCuA2の状態が見られた (Figure 2)。プロ型ではC末端ドメインにあるフェニルアラニン513が活性中心に貫入しているが、活性型ではフェニルアラニンが塞いでいた活性中心に水分子がアクセスできるようになり、銅に配位することでヒスチジン103の配位が外れたと考えられる。CuAサイトの銅イオン占有率は20 %がCuA2、80 %がCuA1の状態で存在し、CuA1とCuA2の間で平衡があることがわかる。

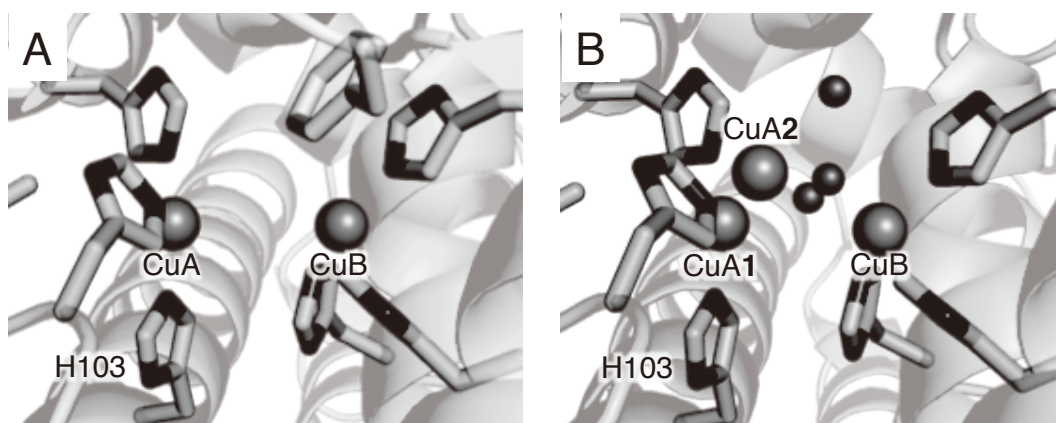


Figure2 Crystal structures of (A) pro-form and (B) active-form

次に基質L-チロシンとの複合体結晶構造解析を試みた。チロシンの濃度と浸漬時間を検討し、10 mMのチロシン溶液に1分間活性型チロシナーゼの結晶を浸けることでチロシン複合体の結晶構造を1.42 Åの分解能で得ることに成功した。活性中心にはチロシンに由来する電子密度がはっきりと観測され、さらにチロシン溶液への浸漬時間を10分に延ばすと、チロシンのオルト位に水酸基に由来する電子密度が観測され、結晶中で反応が進行することを明らかにした。チロシンはヒスチジン 332 との π - π 相互作用、バリン 359 とのCH- π 相互作用、アスパラギンとセリンとの水素結合、そしてCuA2 への配位結合によって活性中心に結合していた。相互作用に関与するアミノ酸残基をアラニンに変えるとチロシンに対する親和性を示すミカエリス定数 K_m 値が上昇し、親和性が低下するという結果も間接的にこれらのアミノ酸残基が基質結合に寄与していることを支持した(Figure 3)。

チロシンが配位することによってCuA2の占有率は20%から30%に増加した。さらに銅イオンを持たないアポ体の結晶をチロシン溶液に浸漬したところ、銅イオンがある場合と全く同じ場所にチロシンが結合している様子が観測され、チロシンは銅イオンへの配位結合がない状態で、アミノ酸残基との相互作用のみによって活性中心に結合できることがわかった。これらの結果は、チロシンが銅イオンに接近するという今までの定説とは逆に、銅イオンがチロシンに対して接近する可能性を示唆しているものであった。今回得られたチロシン複合体の結晶構造と以前報告されている亜鉛置換チロシナーゼ-チロシン複合体結晶構造の重ね合わせを行ったところ、2つの結晶ではチロシンのフェノール部分はほぼ同じ位置にあり、チロシンの結合したCuA2とZnAが同じ位置であることがわかった。これにより、上で述べた亜鉛イオンの位置が異なっていたのは金属の違いによるものではなく、基質の結合によって起こったものであることがわかった。ここまで得られた結晶

構造をもとに修正したチロシナーゼの反応機構は以下のようになる。活性種オキシ体のチロシナーゼに対し、チロシンがこれらのアミノ酸残基との相互作用によって結合する。そしてCuA1の状態から、ヒスチジン 103が外れCuA2にシフトし、チロシンと結合した後、芳香族求電子置換反応でチロシンの水酸化が進行する。その後カテコールの酸化に伴い、銅イオンはCuA2からCuA1の位置に戻り、生成物の解離を促進する。

最後に活性種である酸素結合状態、オキシ体の構造についてCuA1とCuA2で比較を検討した。活性型チロシナーゼではオキシ体は不安定で発生後数分で消滅するが、プロチロシナーゼの状態ではC末端ドメインが酸素結合部位を覆い隠すためオキシ体を安定化することが当研究室の先行研究によってわかっている。そこで、プロ型の変異体と、さらにヒスチジンを欠損させた二重変異体を用いた。二重変異体はヒスチジンが1つ外れているCuA2の状態を擬似的に生じさせるためにヒスチジン 103をフェニルアラニンにした変異体になる。調製後、UV-visスペクトルからどちらの変異体でもオキシ体の形成が確認できた。また共鳴ラマンスペクトルでも、サイドオン型で結合した銅酸素種に由来するピークが観測された。結晶構造では二重変異体では銅が完全にCuA2の位置にシフトし、酸素-酸素間の距離は長く、銅-酸素間の距離は短く変化していた。これらはUV-visスペクトルでバンドが短波長シフトしたこと、ラマンスペクトルでCu-O伸縮の値が大きくなったことと一致する。CuA1からCuA2への遷移によって銅-酸素間の結合が強まり、酸素-酸素間の結合は弱まることを示唆された。2つのオキシ体を重ね合わせるとヒスチジンはほぼ重なっており、銅イオンがCuA1からCuA2に動くときに、結合した酸素はただ引き上げられるだけでなく、片側の酸素原子がチロシンのオルト位に近づくように向きが変化することが示唆された。これらの結果から、CuA1からCuA2への遷移は酸素をより活性化し反応に適した向きに変化させると予想される。

4. 考 察

このように本研究では麹菌由来チロシナーゼ変異体を用いて活性型チロシナーゼの結晶構造を高分解能で決定することに成功した。また基質との複合体結晶構造を決定し、それらの結合様式を明らかにするとともに、触媒サイクルにおいて活性中心の銅イオンの一方が基質の結合に伴い、結合部位や配位構造を変化させ、反応を進行させるという興味深い現象を捉えることに成功した。つまり、銅と酸素が動くことで反応が進行していることが示唆された。従来、一般的に金属酵素においては、触媒に関与する金属は配位するアミノ酸残基に強固に保持されたまま機能すると考えられてきたが、近年、分析手法の発展により、反応の際に

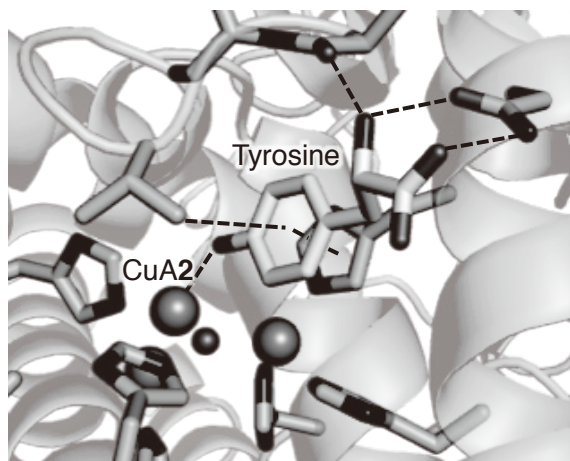


Figure3 Complex with tyrosine

金属の配位子や配位構造が大きく変化することを示す観測結果が報告されている。アルコール脱水素酵素では基質の結合に伴って配位しているアミノ酸残基を変えながら反応を進行させていることが示唆され、古典的な反応機構と新しい反応機構で議論が起こっている最中である。本研究結果は触媒サイクル中で柔軟に動く動的な金属中心という新規な機構を支持する証拠の一つになると考えられる。チロシナーゼのフェノール水酸化反応機構に関して、これまでチロシンが銅イオンに接近し、配位することで反応が進行すると考えられていた。しかしながら、複合体結晶構造から、第1段階としてアミノ酸残基によって形成されている基質結合部位にチロシンが結合することが示唆された。さらにこの結合したチロシンのフェノール性水酸基に対して銅イオンが接近・配位し反応が進行することが考えられる。また、反応後、CuAがCuA2からCuA1に移動することでカテコールや*o*-キノンなどの配位性生産物の解離を促進していると推測される。このように、本研究で得られた結果は活性中心の金属イオンが反応に伴い、大きく結合部位や配位構造を変化させるという過去に見られたことのない現象を初めて直接的に観測したものである。これらの情報

はチロシナーゼの反応機構解明に貢献すると共に、金属酵素における金属中心の柔軟な配位構造の重要性を示す一例となるものと言える。

(引用文献)

- 1) Ismaya WT, Rozeboom J, Weijn A, Mes JJ, Fusetti F, Rozeboom HJ, Wichers HJ, Dijkstra BW: Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone, *Biochemistry* 50, 5477, 2011.
- 2) Goldfeder M, Kanteev M, Isaschar-Ovdat S, Adir N, Fishman A: Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins *Nat. Commun.* 5, 4505, 2014.
- 3) Fujieda N, Yabuta S, Ikeda T, Oyama T, Muraki N, Kurisu G, Itoh S: Crystal structures of copper-depleted and copper-bound fungal pro-tyrosinase: insights into endogenous cysteine-dependent copper incorporation, *J. Biol. Chem.* 288, 22128, 2013.